

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90736

(43)公開日 平成6年(1994)4月5日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C12M 1/00

G01N 27/327

27/416

識別記号

Z

庁内整理番号

7235-2J

7235-2J

FI

G01N 27/30

27/46

351

336 Z

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数10(全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-188434

(22)出願日 平成3年(1991)1月9日

(31)優先権主張番号 093020

(32)優先日 1990年1月9日

(33)優先権主張国 イスラエル(IL)

(71)出願人 591015175

イエダ リサーチ アンド デベロップメ  
ント カンパニー リミテッド  
イスラエル国レホボト ビー オー ボツ  
クス 95

(72)発明者 カルロス ギットラー

イスラエル国レホボト メオノット ブラ  
ジル 4, ザ ワイズマン イン스티テュ  
ート オブ サイエンス気付

(72)発明者 イトズハック ユリ

イスラエル国レホボト, スピノザ ストリ  
ート 3

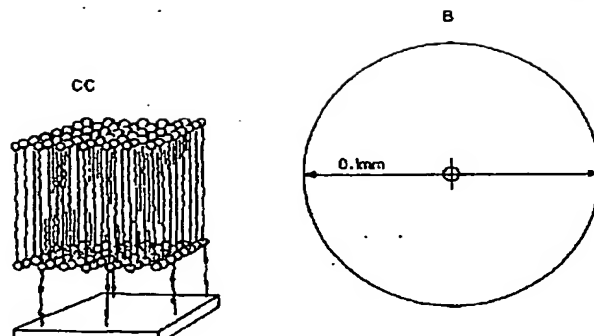
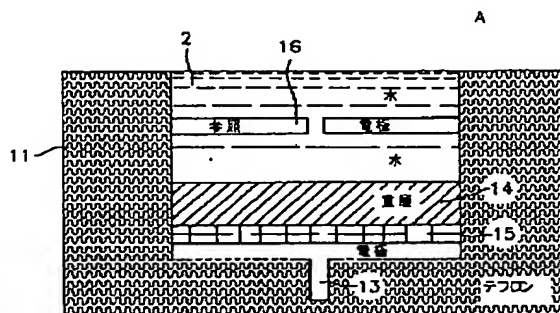
(74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

(54)【発明の名称】 バイオセンサー

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 本発明は、定性および定量分析用のバイオセンサーに関する。

【構成】 本発明は、架橋係留分子を介して記録電極に付着させた脂質二重層からなる両親媒性液体結晶膜によって構成されるバイオセンサーである。脂質二重層は生物または合成イオンチャネルを模したもので、その両表面でバルク水性媒体と連続的に接触している。架橋係留分子は、チオールまたはチオエーテル残基を末端に有するポリオキシアルキレン鎖に連結したリン脂質残基を含有することもできる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) その頂部における参照電極、  
(2) その底部における記録電極、および (3) 合成または生物イオンチャネルを模した脂質二重層からなる両親媒性液体結晶膜から構成され、その脂質二重層は架橋係留分子を介して記録電極に付着したその両面でバルク水性電解質媒体に連続的に接触し、その境界は壁部の非極性物質との非極性的接触によってシールされている定性および定量分析用バイオセンサー。

【請求項 2】 リン脂質残基に接合する親水性スパーサーアームからなる架橋係留分子を介して溶媒和リン脂質二重層が記録電極表面に付着している「請求項 1」記載のバイオセンサー。

【請求項 3】 架橋係留分子は、金属電極の表面に付着するため末端にチオールまたはチオエーテル残基を有するポリオキシアルキレン鎖に結合するホスファチルエタノールアミンからなる「請求項 1 または 2」記載のバイオセンサー。

【請求項 4】 架橋係留分子は式、 $\text{PE-NH-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$  (式中、 $\text{PE-NH}$  はホスファチルエタノールアミンの残基であり、 $n$  は約 7 ～ 約 24 の整数、好ましくは 11 である) を有する「請求項 1 ～ 3」記載のバイオセンサー。

【請求項 5】 イオンチャネルは、天然の受容体、ならびにリガンドおよび第二の蛋白質のチャネル形成部と相互作用する受容部を有するハイブリッド受容体から選ばれる蛋白質である「請求項 1 ～ 4」記載のバイオセンサー。

【請求項 6】 イオンチャネルは、受容部としてハプテンと阻害リガンド成分としてハプテンに対する抗体を有する合成メリチン様ペプチドであり、ハプテンは被験物質または被験物質様残基である「請求項 1 ～ 4」記載のバイオセンサー。

【請求項 7】 イオンチャネルは式、  
 $\text{NH}_2\text{-Gly-Trp-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Cys-Ile-Lys-Gln-アミド}$  で示されるペプチド  $\text{CH-1}$  である「請求項 6」記載のバイオセンサー。

【請求項 8】 リガンドを含有するサンプルを、イオンチャネルがそのリガンドに対する受容体からなるかまたは少なくともその受容部がハイブリッド蛋白質のチャネル形成部からなり、そのリガンドの結合が脂質二重層内のイオンチャネルの開口を誘導して記録電極で測定される電極伝導度の変化を招く「請求項 5」記載のバイオセンサーと接触させる、リガンドの分析方法。

【請求項 9】 被験物質を含有するサンプルを、イオンチャネルがハプテンとして上記被験物質または被験物質様残基を含み、ハプテンに対する抗体に結合している

メリチン様ペプチドである「請求項 6」記載のバイオセンサーと接触させ、この場合、抗体分子が放出されて脂質二重層内のイオンチャネルの開口を誘導し、記録電極で測定される電気伝導度の変化を招来させる被験物質の分析方法。

【請求項 10】 バイオセンサーは「請求項 7」記載のバイオセンサーである「請求項 9」記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】 発明の分野

本発明は、溶媒和脂質二重層が架橋係留分子を介して電極表面に付着しているバイオセンサーに関する。脂質二重層は生物または合成イオンチャネルを模したものである。このバイオセンサーは、定性および定量的分析に有用である。

## 【0002】 発明の背景

生物系は、光、嗅い、神経-神経刺激等のような細胞外シグナルを、連結したカスケード様増幅反応の開始によって認識する。これらの多くでは、カスケードの開始または中間工程に、膜関連イオンチャネルの開口が関与している。リガンド活性化チャネルにおいては、その過程は、チャネル蛋白質に構造的にまたは機械的に連結した特異的受容体に対する小さなエフェクター分子 (神経伝達物質、オードラントまたはフレーバー) の結合によって開始される。これは脂質二重層を横切る孔部の開口を招き、膜の電気のコングクタンスの段階的増大を生じるチャネル蛋白質のコンホメーションの変化を誘導する。生物チャネルは人工脂質二重層に機能的に再生することが可能で、これは生体膜に生じるのと実質的に同一のエフェクター誘導電流を招来する。現在利用できる電子増幅手段によればシグナルチャネルの開口現象を検知することができる。

【0003】 合成または天然起源の小さな両親媒性ペプチドが人工二重層でイオンチャネルを形成することが明らかにされている。二重層を横切る伝導路は、水の小孔の壁部を形成する数個のペプチドの整合的集合によって形成される。さらに、それらの一次配列を修飾することにより、特定のチャネルの性質を変更できる。膜の内面におけるペプチドの側方および回転可動性を制限することによって、独立に、チャネル形成を制御することができる。

【0004】 したがって、イオンチャネルは、脂質二重層の核によって形成された誘導体を通過するイオンの流れを制御する装置である。二重層を、検知電極に、1) 高度に安定で、2) 蛋白質やペプチドがその内部にチャネルを作る媒体として働く能力を保持するように付着できれば、独特の種類のバイオセンサーが得られるはずである。

【0005】 両親媒性分子と固体表面との境界層は以前から知られている。ラングミュアとプロジェクトによって導入された方法が、電極へのリン脂質の吸着が関与

る装置の開発にいまだに利用されている。この方法により、両親媒性分子の単分子膜が水-空気界面から固体表面に、それを順序正しく水コンパートメント内に押し込みついで引き上げると、移される。分子の両親媒性と水-空気界面から固体表面の通過の順序によって、層は固体表面に対する疎水性-親水性の方向性を変え、したがって累積二重層が形成される。これらの層が加湿条件下に作成されると、限られた可動性を有するわずかな水分子が二重層内に捕捉される。しかしながら、これらの系は二重層の間に、バルク型の溶媒水分子を保持することはできない。液体様の界面であれば、現実には、内部の累積マトリックスから外部層が脱着してしまうからである。したがって、第一層と電極表面の間のバルク水性媒体が絶対に容認できないことは明白である。

【0006】ラングミュア-プロジェット型デバイスにおけるバルク溶媒水の欠如は、生物学的様系の模倣、とくに機能性イオンチャネル形成ポリペプチドの導入にそれらを不適当にする。

【0007】ラングミュア-プロジェットの方法に従って作成された先行技術のデバイスの2つの例が、豪州特許出願AU40123/85および、WO89/01159号として公開されたPCT国際出願に見出される。

【0008】AU40123/85には、検出すべき選ばれた物質が膜表面に存在すると、イオンを通過するように適合されたフィルムまたは膜を利用する固体状態の電気化学センサーが開示されている。とくに、この電気化学センサーは、ベース基層と、ベース基層に付着した物質の層を包含し、層へのイオン輸送に応答して電流を生じる。この層は実際、イオン流を電流に転換または変換する。また、イオンを検出すべき物質または化学種を含有する液体から層に輸送するため、層に付着させる膜を包含する。膜は、化学種と相互作用してイオンを液体から膜へ浸透させるゲート分子を包含する。

【0009】WO89/01159号は、自己集合性両親媒性分子がぎっしりつまって配列した膜で、複数のイオンチャネルおよび/または支持体と接合して受容体分子を構成する自己集合性分子の少なくとも一部からなることを特徴とする膜が記載されている。イオンチャネルは、ヘリックスおよびその集合体、コロナンド、クリプタンド、ポタンドならびにそれらの配合体を形成できるペプチドからなる群より選ばれる。支持体と接合した受容体分子からなる両親媒性分子においては、受容体分子は受容部位を有し、免疫グロブリン、抗体、抗体フラグメント、染料、酵素およびレクチンからなる群より選ばれる。支持体部は、脂質ヘッド基、炭化水素鎖、架橋可能分子および膜蛋白質からなる群より選ばれる。支持体部は受容体分子と受容部位から離れた末端において付着する。固体表面に付着したこのような膜二重層からなるバイオセンサーも開示されている。

【0010】発明の要約

本発明は、合成または生物イオンチャネルを模倣した、電極付着溶媒和脂質二重層からなるバイオセンサーに関する。チャネルの開口は、検出される分子との相互作用によって誘導される。これは二重層伝導度の段階的増大を生じ、それが電極によって検知される。

【0011】とくに、脂質二重層は、架橋係留分子を介して記録電極に付着した両親媒性液体結晶膜であり、その両表面においてバルク水性電解質媒体に連続的に接触している。

【0012】架橋係留分子は、リン脂質残基、好ましくは、電極物質に強固に結合可能な残基たとえば-SHまたはチオエーテル残基を末端に有するポリオキシエチレン鎖をもつホスファチジルエタノールアミンに連結した親水性スパーサーアームからなる。

【0013】図面の簡単な説明

図1は本発明のバイオセンサーの一般的設計を例示する図である。図2は溶媒和脂質二重層を係留している提案された電極を例示する図である。図3はハチ毒、メリチンの構造を示す図である。図4は本発明のペプチドCH-1の構造を示す図である。図5は、脂質二重層内に浸漬したヘリックス状の棒状集合体としてCH-1を模式的に示している。(A)は集合体の中心に向いた極性側鎖基(白丸、正確な縮尺で描かれたものではない)を示す。集合体のシッファー・エドモンドソンらせん投影(B)は、極性中心水性小孔領域を示している。ハプテン付着部位は矩形で描かれている。図6はCH-1へのハプテンの付着部位を示す。図7はチャネル形成免疫検定法の原理を模式的に示す図である。図8はCH-1のイオンチャネル活性を示す。(A)はアソレクチンリポソーム中、バリノマイシン誘導 $K^+$ 拡散電位の脱分極を示す。(B)はガラス毛细管の先端における平面脂質二重層内の単一チャネル活性を示す。

【0014】好ましい態様の説明

本発明のバイオセンサーは、参照電極と記録電極からなり、これに架橋係留分子を介して両親媒性液体結晶脂質二重層膜が付着し、この膜はその両面でバルク水性電解質媒体に連続的に接触し、その二重層境界は脂質鎖の疎水性成分と非極性壁部の間の非極性接触によってシールされる。この二重層は、合成または生物イオンチャネルを模したもので、その開口は適当な外的影響との相互作用により、たとえば検出すべきリガンドによって誘導され、その結果、膜の電気的性質に変化を生じ、それが電極によって感知され、測定される。

【0015】本発明における好ましい脂質は、リン脂質たとえば大豆アソレクチンであり、好ましいイオンチャネルはヘリックスおよび集合体を形成できる蛋白質または合成ペプチドから構成される。

【0016】このデバイスの核である二重層は、蛋白質およびペプチドがその生物学的特異的活動をその中で発揮できる適当な媒体を構成しなければならないので、液

10

20

30

40

50

体結晶状態に保持される。すなわち、チャネル蛋白質およびペプチドは、イオンチャネルの自発的形が可能なように、十分な側方可動性を保持していなければならない。同時に、膜はその内部に取り付けられるバイオセンサーデバイスが長い寿命を示すように機械的に安定でなければならない。適切に機能するためには、リン脂質二重層はバルク水媒体中に浸漬していなければならない。したがって、膜の両側には常にバルク水が存在しなければならない。

【0017】膜の電極表面への係留は、他の二重層構成成分の側方可動性により誘発される可能性がある干渉を最小にするように、二重層の機械的強化を目的に設計されている。この要求に合致するためには、細胞骨格または細胞マトリックスに対する細胞膜の相互作用に基づくアプローチが採用された。細胞骨格は、すべての生物細胞に共通な、膜の内側表面における別個の点に結合するポリペプチド肋材によって主として作られている機械的支持系である。類似の連結部により、赤血球や上皮細胞のような細胞の膜が長期間にわたり著しい機械的ストレスに対して耐えることを可能にしている。

【0018】これらの天然の系に従って、脂質二重層を電極に付着させる新規な方法が案出された。すなわち、2つの主要成分、一般的なリン脂質たとえばホスファチジルエタノールアミン(PE)、および末端が金属に対して高い親和性を有する残基で置換された高親水性スパーサーアームから構成される錨分子の合成を包含する。たとえば、様々な鎖長のオキシエチレンとその末端にチオールまたはチオエーテル残基を含有するホスファチジルエタノールアミン誘導体を特定の錨分子として、チャネル機能に必要な動的性質を維持した安定な溶媒和二重層が、本発明により、金電極表面に付着された。

【0019】本発明による新規な電極付着脂質二重層を図2に例示する。この新規な構造は主として、二重層と電極の両表面にほぼ垂直に配置された複数の細長い錨分子または極性スパーサー架橋によって、電極(好ましくは、貴金属たとえば銀、金、白金、または金属メッキ)に付着された脂質二重層からなる。電極に付着した、ある厚さの層をなす全構造が水性媒体中に浸漬され、脂質二重層が膜を決定する。

【0020】本発明によるバイオセンサーの主要な特徴を図1に示す。テフロンブロック(11)は円形のウェル(12)を包含し、その底部に電極(13)が配置される。この電極(13)に、リン脂質二重層(14)

(挿入図および図2も参照)が、二重層(14)と電極(13)の間のバルク水層(15)が存在するようにして付着される。二重層の境界は側方で、リン脂質の疎水性成分とテフロンとの間の非極性接触によってシールされる。二重層はさらに、イオンチャネル形成ペプチド(図には示していない)を含有する。第二の参照電極(16)は二重層の上方に配置される。テフロン(の代わり

に、炭化水素と強力に相互作用するプラスチック材料、たとえばポリスチレンを使用することもできる。

【0021】すなわち、その両表面でバルク水性媒体と強固に接触保持された両親媒性リン脂質二重層が形成される。この構造により、約50Åから約75Åのオーダーの厚さをもち、したがって包埋された機能性ペプチドおよび蛋白質を支持できる液体結晶膜が生成する。リン脂質膜は電極に接近して、それと平行に配置されるが、それとの間に空間をおいて、約15Å~50Åの長さの架橋錨分子によってそれと付着され、全構造が水性媒体中に置かれる。径約2mmのバイオセンサーを試験し、著しく安定であることが見出された。

【0022】膜は、リン脂質に接合した適当な親水性スパーサーアームを介して電極に付着した溶媒和リン脂質二重層からなる。使用が好ましいアームは、ポリ(オキシエチレン)<sub>n</sub>(nは約8~約25であることが好ましい)から構成されるが、鎖には他の極性残基が含まれていてもよく、たとえばポリアミノ酸鎖でもよい。鎖はすべて、その末端が、チオールもしくはチオエーテル残基、またはその他の電極に高い親和性をもつ適当な付着分子によって終結する。これらの分子の親水性部分は、親水性部分が水と強い相互作用を示す複数のオキシエチレン鎖で作られている天然のある種の界面活性剤分子、たとえばTritonと化学的に類似している。

【0023】この付着様式では、脂質二重層の組成に混合脂質を使用することが可能になる。たとえば、その小成分は付着に用いられるスパーサー分子をもつリン脂質で、大部分のリン脂質が二重層構造を決定するように選択できる。

【0024】電極へ付着させる二重層の付着を細長いスパーサー分子によって行う本発明のアプローチには、以下の新しい特徴がある。すなわち、a)バルク水が電極表面および二重層の両側に存在する、b)非係留脂質および二重層内に導入されたポリペプチドの移動が可能である、c)二重層は適度の安定性と、電極表面に関して固定された幾何的配置を有し、これはその表面への錨分子の反復付着によるものである、d)上記の固定された幾何的配置により、脂質二重層は電極の輪郭に従うので、原子分解時における電極表面の絶対的な平滑化は重要ではない。

【0025】本発明の二重層は、その開口によって膜を通すイオンの通過が可能になるイオンチャネルを模倣したものである。

【0026】チャネルを開口させるには少なくとも2つの方法がある。そのデバイス中に存在する成分蛋白質またはペプチドによって、チャネルの開口は2種の別個の機構によって誘発できる。第一は、予め存在する固定または組立てチャネルのリガンド誘発開口である。第二の機構は、両親媒性ペプチドが自発的に集合してチャネル集合体を形成するのを妨げている動揺の特異的な除去に

基づくものである。

【0027】第一の分類には、生体膜中に存在する天然のチャネル、たとえばアセチルコリンまたはGABA受容体である。これらのチャネルは、適当な細胞から高度に精製するか、または遺伝子操作によって得られる。ついで、これらを電極支持人工二重層内に導入できる。次に、二重層を、非占拠時に受容体-チャネルが閉じた状態で支持されるように調整する。リガンドがその特異的受容体部位に結合すると、神経系の場合のように、チャネルの開口の引き金となるコンホメーション変化が誘発される。このアプローチは、*in vivo*における受容体によるアゴニストまたはリガンド感知をそのまま模倣したデバイスの形成を可能にする。アセチルコリン受容体の場合には、さらに、センサー集合体にアセチルコリンエステラーゼを添加すれば、アゴニストおよびアンタゴニスト両者に対する神経系の感受性のシミュレーションが可能になる。この可能性によりまた、第二の蛋白質のリガンドまたはチャネル形成部と相互作用する反復部位を含有するハイブリッド受容体分子が本発明により考慮できる。これらのハイブリッド分子は慣用の遺伝子操作法で製造できる。

【0028】第二の可能性は、メリチンまたはメリチン様ペプチド、たとえば本明細書においてはCH-1と呼ぶ新規な合成ペプチド（下記参照）に関するものである。これらは、適当な接近と軸方向をもって適度の集合状態に到着したとき、イオンチャネルとして機能する集合体を形成できる（図5参照）。この分類では、バイオセンサーは、要素の反復部分としてハプテン、阻害性リガンド成分として抗体の使用に基づいて構築される。

【0029】CH-1ハプテン（図6参照）が二重層内に挿入されると参照電極のコンパートメントに向けられるCH-1の一端にハプテンを付着させると、上部溶媒コンパートメントに添加されたハプテンに対するモノクローナル抗体との相互作用が可能になる。ハプテン-CH-1に抗体が結合している限り、それらは、立体障害により、イオンチャネルの形成に必要な合成ハプテン-CH-1の適切な集合を防止する（図7，上部参照）。検知すべき遊離のハプテンまたはハプテン様分子（被験物質）の添加は、抗体結合部位に対する競合および抗体との相互作用からのハプテン-CH-1の放出により、イオンチャネルの自発的形成（図7，下部参照）とイオン伝導度の増大によるその検知を可能にする。この方法により、それに対する特異的モノクローナル抗体を生成する分子を検出できるバイオセンサーの設計が可能になる。

【0030】通常、単一のチャネルの伝導性は高い（ $pS$ と $nS$ の間）ことから、数個の分子の結合によって誘発されるただ1個のチャネルの開口も容易に検知できる。これらの系で記録された感度はナノモルの範囲である。

【0031】上述のように、イオンチャネルまたはイオンチャネル部位の化学体との相互作用で、このようなチャネルの開口を生じる。同様に、このようなチャネルは、適当な電磁線たとえばUVからIRまでおよびもっと高波長の種類の光のような電磁線と相互作用して、開口および伝導性の変化を生じさせることができる。光と相互作用してその構造を変え、その結果、センサーの伝導性を変化させる発色体またはその他の光感受体からなるイオンチャネルを構築することもできる。この目的に適当な分子は、適当な感作分子たとえばカルボシアニンまたはメロシアニンによってより長い波長に感作できるスチルベン誘導体を含有するペプチドである。

【0032】センサーイオンチャネルを閉鎖状態に戻すためには、ある種の弛緩機構が付与される。受容体結合アゴニストまたはリガンドは、チャネル-受容部位から、結合した化学体を除去するのに適当な酵素を二重層内に導入するかまたは二重層の上方の水性コンパートメント内のセルの壁部に付着させることによって除去される。酵素活性は、デバイスを検知すべき物質に暴露したとき、その濃度が一過性に上昇してチャネルを開くように調整される。本発明の新規なデバイスではジメンションが縮小されているので、拡散による応答時間が短縮される。次に、酵素分解により、検出すべき物質は低レベルに減少し、検出サイクルの再開が可能になる。チャネルと酵素の適当な組合せは実験によって容易に確立することができる。

【0033】チャネルの抗原-抗体依存性の摂動は2工程洗浄操作によって回復する。第一の洗浄で検出分子-抗体複合体が除去され、第二の操作は主として、遊離抗体分子の補充の働きがある。

【0034】電極と二重層の間の水層内における電解質媒体の復元は逆イオン流入によって行われる。検出および参照電極の間に電場を発生させる。十分なシグナルが感知されたならば、同じ機構がイオンの流入を阻止するようにして、センサーの寿命を長くする。外部から負荷される電場に対するイオンチャネルの開口/閉鎖の感受性は、ペプチドの双極子能率、その空間的方向性、およびヘリックス骨格への機械的結合に依存する。

【0035】本発明のデバイスは様々の要求に容易に適用できる電子工学システムの集積部とすることができる。広スペクトルの化学的シグナルの検出に適している。脂質二重層の脂質成分の制御により、この系は4℃～40℃の温度で機能するようにできる。デバイスを熱調節ペルチェ体と適宜連結することにより操作温度を0℃以下または40℃以上に拡大できる。

【0036】適当な脂質二重層が安定な機能様式で電極に付着されたならば、バイオセンサーは、抗体が作成できるかまたはリガンド活性化天然チャネルが存在する任意、所望の分子を検出するために使用できる。必然に応じて、様々な成分が各種シグナルの検出のために使用で

きる。

【0037】次に本発明を以下の実施例によって例示するが、これは本発明を限定するものではない。

#### 【0038】例1 ペプチド CH-1 の合成

小(アミノ酸20~25個)ペプチドによるイオンチャネルの生成の基盤となる原理は完全にはわかっていない。アラメチシンおよびメリチン(ミツバチ毒の乾燥重量の50%)のようなペプチドはそれらが両親媒性ヘリックスのペプチド(AHP)として挙動することから、イオンチャネルを形成することが示唆されている。すなわち、極性アミノ酸は、3.4周期性でポリペプチド鎖中に存在する。 $\alpha$ -ヘリックスの1ターンあたり3.6残基の生成では、極性側鎖はらせんロッドの同じ側を向くようになる。これはメリチンの配列ならびにそれが形成する $\alpha$ -らせんロッドの側方および上方投射によって例示できる(図3参照)。

【0039】メリチンは、本発明のペプチドの設計の出発点として選択された。これは水溶性で、通常テトラマーとして存在するものと思われる。しかしながら、それは多分、ポリペプチドのNH<sub>2</sub>末端における非極性の6個のアミノ酸セグメント(下線)の存在により、脂質二重層内に自発的に移動する。二重層内に取り込まれると、それは $\alpha$ -ヘリックス二次構造をよそおい、陰イオン選択性チャネルを形成する。このチャネルは、膜の面内における数個のヘリックスの集合体からなり、その疎水性側鎖が周囲の脂質と接触してできている。それらの親水性側鎖は脂質とは逆の方向を向いて、水性イオン伝導孔を形成する。しかしながら、経時的におよび/または二重層内にさらにメリチンが導入されるに及び、比較的に大きな孔部が生成し、セルの分解が優勢になってくる。メリチンの配列(図3)の調査に際して、それはカルボキシ末端の6個の塩基性アミノ酸のクラスター(ボールドおよび下線)をもつことが認められ、この塩基性アミノ酸のクラスターが、ポリ-L-リジンの場合のように、メリチンの分解性に関与するものと考えられた。

【0040】メリチンは、アラメチシン同様、14の位置にプロリンを含有する。興味あることに、プロリンは大部分の天然チャネルのイオン伝導セグメントの配列内に豊富である。プロリンは、その存在により規則的な $\alpha$ -ヘリックス骨格-水素結合の破壊を生じるアミノ酸である。アミド残基の1個または2個のカルボニル基は水素結合せず、その非結合電子は $\alpha$ -ヘリックスの全体的極性および両親媒性コンフィギュレーションに寄与していない。

【0041】上述の考慮に基づき、メリチンの同族体を合成した。これは本明細書ではメリチンと呼び、以下の配列を有する。NH<sub>2</sub>-Gly-Trp-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Cys-Ile-Lys-Gln-ア

ミド

【0042】CH-1(図4)にはいくつかの重要な修飾が行われた。第一に、メリチンのカルボキシ末端の3個の塩基性アミノ酸および1個のグルタミンは除去され、CH-1からは分解性が消失している。第二に、メリチンの残基2および19は、イソロイシンがトリプトファンに、トリプトファンがシステインにそれぞれ置換されている。CH-1分子の他の部分はメリチンと同じである。位置19のシステインは反応中心として導入された。これは、直接付着またはジスルフィド生成により、ヘリックス構造に変化を与えないで蛍光プローブ、ハプテンまたは所望のエピトープを含むペプチドの置換を可能にする。それは、合成後に、メチルジスルフィド誘導体として(システイン-S-S-CH<sub>3</sub>)保護された。還元すると、ペプチドCH-1のバックグランドを変えないで容易に蛍光体を付着できる反応基が生成する。システイン-19はハプテンまたは所望のエピトープを含有するペプチドとの混合ジスルフィド接合体を形成させる(図5参照)反応中心として使用するのが最も重要である。

【0043】側方での会合により、CH-1ペプチド集合体はイオンチャネルを形成する。19の位置のシステインは、ハプテンの容易な付着を可能にする。たとえば、ハプテンを含有するトリニトロベンゼン(TNB)とのCH-1誘導体が製造された。このハプテンへの抗体、たとえば抗-TNB抗体の結合は、ポリペプチドの集合を阻害する。遊離のハプテンまたはハプテン様誘導体(被験物質)、たとえばTNBまたは他のニトロ化芳香族化合物誘導体の存在は、抗体から競合によってCH-1ハプテン残基(たとえばCH-1-TNB)を放出させて、イオンチャネルを形成させる。これによって、CH-1に付着したハプテン誘導体(たとえばTNBまたは他のニトロ化芳香族化合物誘導体)と同一または類似の被験物質の存在をモニタリングできるバイオセンサーの構築が可能になる。CH-1にジスルフィド結合で付着させたシステイン含有ペプチドエピトープの使用も適当である。

【0044】CH-1 $\alpha$ -ヘリックスの比較的に親水性の角が立ったセクターは、テトラマー集合体の安定なイオンチャネルが構築されていることを示すものと思われる。図5は、脂質二重層内に浸漬されたヘリックスロッド集合体としてCH-1を模式的に示した図である。

(A)に 極性の側鎖基(白い丸、正しい縮尺で描かれてはいない)が集合体の中心に向かっていて、集合体のシッフエー-エドムンセンによるヘリックス投射

(B)は、極性の中心水性孔部領域を示している。ハプテン付着部位は矩形で示されている。

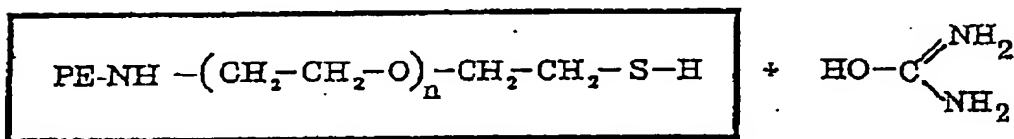
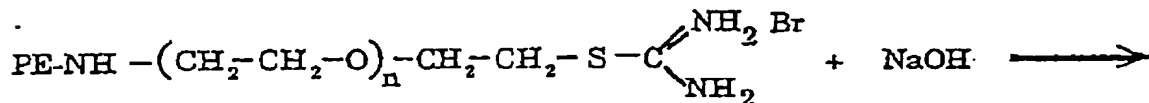
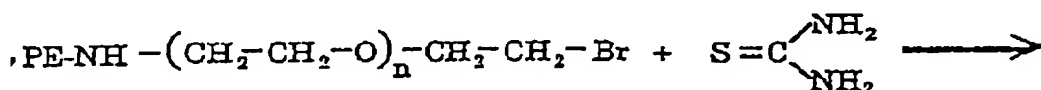
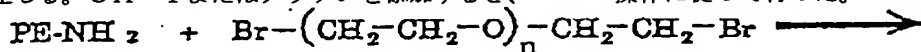
【0045】集合を妨害する因子は開口したチャネルの形成の確率を低下させるものと思われる。チャネルの開口は、二重層面内における自発的な側方拡散による一過



性の集合体形成がその原因になるという事実はまた、拡散に対する任意の妨害もイオンチャネル形成の確率を低下させることを示唆する。

【0046】ペプチドCH-1は、慣用の固相シンセサイザーに基づく独特のペプチドシンセサイザーを用い、改良されたカップリングおよび除去方法を用いて製造された。22工程のCH-1合成の総収率は80%であった。ついでペプチドを99%以上に精製すると、HPLC分析により単一の対称的なピークを生じた。

【0047】CH-1のチャネル形成活性の特徴は肉眼および顕微鏡レベルで検査した。肉眼のレベルでは、リポソーム中のバリノマイシン電位を消失させるのに必要なCH-1の量を、ナトリウム媒体中に置いたK<sup>+</sup>含有リポソームへのバリノマイシンの添加によるLowらの方法によって測定した。これは、膜内への陽イオン性染料の移動の誘発、蛍光の消失が認められる膜内外電位差を生じる。CH-1またはメリチンを添加すると、



【0050】ホスファチジルエタノールアミン-N-(オキシエチレン)<sub>11</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SHの合成は次のようにして実施した。すなわち、ポリエチレングリコール製品(平均分子量600)を使用した。これは平均12個のオキシエチレン基を含有する。それをホスファチジルエタノールアミンと反応させるためには、それをまず三塩化リンと反応させてジブromo誘導体に変換した。水抽出液をベンゼンで抽出して低分子量画分を除去し、ついでα, ω-ジブromoポリ(オキシエチレン)<sub>12</sub>をクロロホルムで抽出した。これは、プロトンNMR、臭素の分析および2-ブタノン/H<sub>2</sub>O(1:1)による薄層クロマトグラフィー(R<sub>f</sub>=0.01)で特徴づけられた。ジブromoポリオキシエチレン誘導体(過剰)をテトラヒドロフラン-トリエチルアミン中、ホスファチジルアミンと封管内で加熱して結合させた。チオ尿素を添加して、テトラヒドロフランをイソプロパノールで置換させた。2時間還流するとブromo誘導体がイソ

リポソーム膜内へのそれらの導入がバリノマイシン電位差を消失させ、染料の蛍光を回復させるイオンチャネルを誘発する。CH-1は、バリノマイシン電位差を消失させる能力に関しては、メリチンよりも有効であることが観察された(図8A)。

【0048】図8Bは、CH-1およびメリチンの単一チャネルの活性を顕微鏡で調べた結果を示している。これらの活性は、毛管二重層測定法を用いた標準イオンチャネル測定装置によって記録した。CH-1およびメリチンの等濃度(0.1mM NaCl中ペプチド0.1μg)は、明白な単一チャネル形成を生じ、それは有意な期間、開かれたままであることが観察できた。

【0049】例2 架橋係留分子の合成  
末端にメルカプタン基を有するポリエチレングリコールで誘導体化した一連の同類のホスファチジルエタノールアミン(PE)を製造して試験した。合成は次の一般的操作に従って行った。

チオウロニウム塩に変換され、これを次に穏和なアルカリ加水分解によってメルカプタンに変換した。ホスファチジルエタノールアミン-N-ポリ(オキシエチレン)-SHをシリカゲル中、落出液としてクロロホルム-メタノール-酢酸-水を用いたクロマトグラフィーによって精製した。この誘導体は、リン酸塩とメルカプト基の1:1の存在によって特徴づけられた(5, 5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸からチオニトロ安息香酸の遊離によって測定)。さらに、これは、リン酸基1個あたり2個のアシル脂肪酸鎖を含有した。このアームは30Åのオーダーの水相スペーシングを支持する。

【0051】例3 金電極の表面における溶媒和二重層の形成方法

### 3. 1. テフロン壁部のコーティング

金線の導入前に、テフロンブロック内のウエルをヘキサン中ヘキセデカン1滴で満たした。これをテフロンと20分間相互作用させる。ついでこれを除去し、ウエルを

0.1mM NaCl, 0.05M HEPES 緩衝液、pH7.4の液で洗浄した。

### 【0052】3.2. 電極表面の調整

電極は金線を底部からウェル内に、その一端がウェル内でシールされるように挿入して調製した。挿入前に、金線を酸でエッチングして洗浄した。

### 【0053】3.3. 混合ミセルの調製

大豆リン脂質をアセントから抽出して中性脂肪を除去することにより精製し、乾燥し、ついでクロロホルムメタノール(2:1)に溶解した。この溶液に、クロロホルム溶液中コレステロールを、リン脂質とコレステロールのモル比が5:1になるように添加した。さらに、テトラヒドロフランに溶解したホスファチジルエタノールアミン-N-エチレン-(オキシエチレン)<sub>10</sub>エチレンメルカプタン(例2の架橋分子)を、リン脂質と架橋分子のモル比が50:1になるように添加した。さらに、 $\alpha$ -トコフェロールを、リン脂質200あたり $\alpha$ -トコフェロール1のモル比で添加した。混合後、溶媒を除去し、脂質を0.1mM NaCl, 0.05M HEPES緩衝液、pH7.4中オクチルグルコシドの溶液を添加して分散させ、ミセルを形成させた。オクチルグルコシドは、各リン脂質あたり2分子の界面活性剤が存在するように添加した。この比により、リン脂質、コレステロールおよび架橋アームを含有するオクチルグルコシドの混合ミセルが形成される。

【0054】3.4. 混合ミセルの金電極への付着  
混合ミセルの溶液(3.3参照)を、テフロンウェルに加え、ミセルを架橋アームによって金に付着させる(2時間〜一夜、室温)。混合ミセルが金電極に付着したのち、金電極の反対の末端でウェルに透析膜を付着させ、ウェル内に空気が捕捉されなかったことを確認した。全集合体をついで、0.1mM NaCl, 0.05M HEPES緩衝液、pH7.4を充填した大容器中に導入し、オクチルグルコシドを透析によって除去した。これには24時間を要した。透析膜を除去し、電極上の溶液を注意深く除去し、数回、0.1mM NaCl, 0.05M HEPES緩衝液、pH7.4によって置換した。

### 【0055】3.5. 生成した溶媒和二重層の試験

アームによる金へのミセルの付着について、界面活性剤の透析を行う。これにより、電極に付着した連続二重層の生成と、その側部のヘキサデカン被覆テフロンとの相互作用によるシールが行われた。さらに、過剰の脂質がリポソームを形成するが、これは3.4に詳述した洗浄操作で除去される。電極をウェルの上部に置くことにより、この対照電極と金電極の間のインピーダンスの測定が可能になる。金属極に付着する二重層の形成とその側部のヘキサデカン被覆テフロンとの相互作用によるシールは、電極間の電流に対するきわめて高いインピーダンスの存在によって確認される。得られた値は、基礎伝達

度が5~10pSのオーダーであることを示している。測定はMontal平面脂質二重層による単一チャネル形成の測定に使用したのと同じ装置を用いて実施した。

### 【0056】例4 金付着溶媒和二重層の被験物質の濃度測定のための使用

本発明のデバイスは、サンプル中の被験物質の分析方法に有用である。この場合、サンプルは、ハプテンとして被験物質または被験物質残基を含有するメリチン様ペプチドを模した脂質二重層からなり、全分子はハプテンに対する抗体に結合しているバイオセンサーと接触させる。ここに詳述する例では、ペプチドCH-1に接着させるハプテンとしてトリニトロベンゼン(TNB)を使用し、被験物質としての遊離TNB-誘導体の濃度を測定した。同様に、CH-1に付着させたサイロキシンを使用して、サンプル中の遊離サイロキシンを測定できる。

### 【0057】4.1. CH-1へのハプテン基の付着

標準的ペプチド合成法によって、N-TNB- $\beta$ -アラニル-システインを製造した。これをホウ酸緩衝液、pH8.0中で当量のジチオビス-ニトロ安息香酸と反応させた。反応終了後(チオニトロ安息香酸の遊離を412nmで測定した)、これを精製することなく0.6mM DTTによりpH9.0で予め処理し、ついでHPLCでCH-1のシステイン-19のチオール基を保護するために用いられたチオメチル基を除去したCH-1の溶液に加えた。反応はチオニトロ安息香酸の遊離によって追跡した。反応完了後、生成したN-TNB- $\beta$ -アラニル-システイン-CH-1ジスルフィドを、アセトニトリル勾配を用いたHPLCによって精製した。

### 【0058】4.2. N-TNB- $\beta$ -アラニル-システイン-CH-1ジスルフィドとTNP-抗体および金電極に付着した二重層の相互作用

N-TNB- $\beta$ -アラニル-システイン-CH-1ジスルフィド(ハプテン-CH-1)を、TNB残基に対する高い特異性と高い親和性定数を有するモノクローナル抗体と処理した。ハプテン-CH-1のチャネル活性を中和するのに必要な量を、ハプテン-CH-1の抗-ハプテン抗体による、Montalセットアップでの平面脂質二重層の存在下における滴定で測定した。この化学量論がわかると、ハプテン-CH-1と抗-ハプテン抗体が、チャネルを中和する比率で、金電極に付着した二重層に添加される。測定された基礎チャネル活性は無視できるものである。遊離N-TNB-アラニルシステインを被験物質として添加すると、遊離TNB-誘導対とハプテン-CH-1-抗-ハプテン抗体複合体の競合によりハプテン-CH-1の放出が起こり、これが二重層中にイオンチャネルを形成させる。チャネル活性は、遊離されたハプテン-CH-1の濃度に相関し、一方これは被験物質の濃度に相関する。測定されるハプテン-C



H-1 の濃度は抗体親和性に依存して変動する。一般に、チャンネル形成はきわめて高い感度で検出できるので、ハプテンに対する抗-H-1 抗体の親和性曲線の最初の 3 分の 1 に比例性が観察される。  $3 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}$  ,  $1^{-1}$  の親和性をもつ抗体では、平均濃度  $10^{-8} \text{ M}$  の被験物質が検出できる。与えられた範囲内の応答の直線性は与えられた抗体について適当である。しかしながら、各抗体の検量は必要である。

【0059】例5 電極に付着したチャネル蛋白質を含有する二重層の生成方法

生物イオンチャネルを模倣した脂質二重層からなる本発明のバイオセンサーはサンプル中のリガンドの検出に有用である。この場合、サンプルは、受容体またはそのリガンドの受容体の受容部からなるハイブリッド分子によって構成されるイオンチャネルを包含するバイオセンサーと接触させる。

【0060】 5. 1. アセチルコリン受容体を含有する  
混合ミセルの製造

アセチルコリン受容体は、Naja naja トキシンとの親和性クロマトグラフィーを用いる標準方法で精製した。ついでこれを、3. 3に記載したと同一の成分を含む混合ミセル中に導入した。リン脂質とアセチルコリン受容体の比は200:1であった。

【0061】5. 2. 金電極への混合ミセルの付着  
電極に付着した二重層の生成は、3. 4に上述したのと  
ほぼ同様にして実施した。

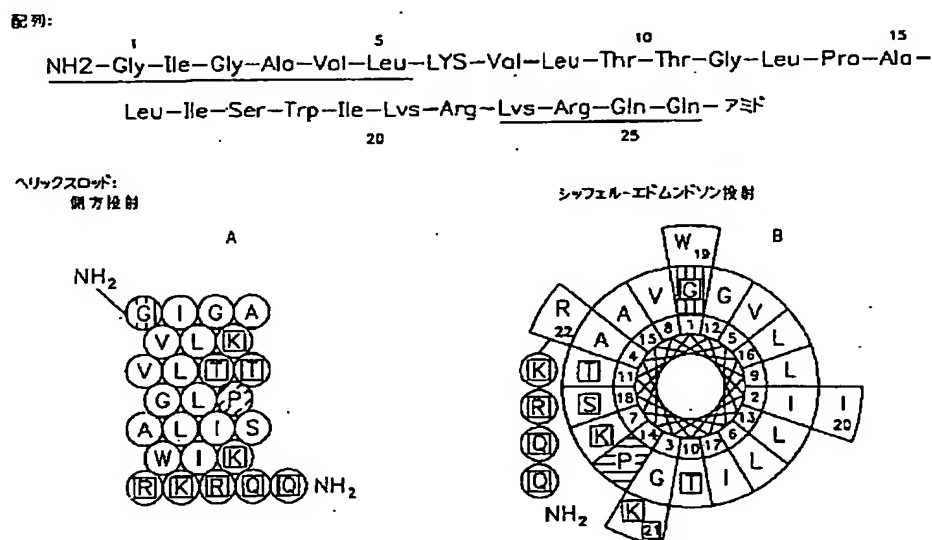
【0062】5. 3. アセチルコリン存在下の活性  
アセチルコリン受容体を導入した膜で観察された基礎活性は、ドパントを添加しない場合の値よりもわずかに高

かった。伝導度は $10 \sim 15 \text{ pS}$ の間で変動した。電極に付着した二重層の外側表面が浸漬されている媒体にアセチルコリンを添加すると、ノイズのレベルの上昇が出現し、異なる活性レベルを有する別個のチャネル現象が観察される。この活性の上昇は30分ほど続いた。総ノイズレベルの上昇および伝達性の上昇は、アセチルコリンの存在の検知を可能にする。アセチルコリンがなければ、また受容体と結合しない他のアミンの存在下には活性は低く維持される。アセチルコリンの添加により、シグナルは明らかに増大する。

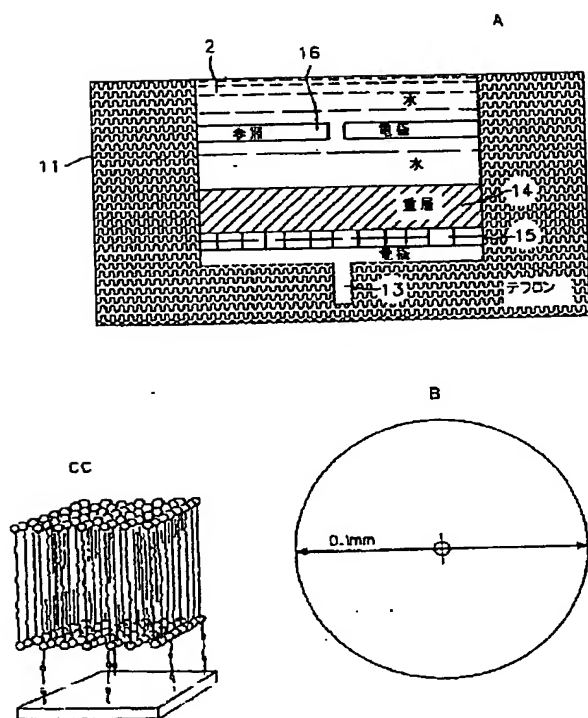
【図面の簡単な説明】

図1は本発明のバイオセンサーの一般的設計を例示する図である。図2は溶媒和脂質二重層を保留している提案された電極を例示する図である。図3はハチ毒、メリチンの構造を示す図である。図4は本発明のペプチドCH-1の構造を示す図である。図5は脂質二重層内に浸漬したヘリックス状の棒状集合体としてCH-1を模式的に示している。(A)は集合体の中心に向けた極性側鎖基(白丸、正確な縮尺で描かれたものではない)を示す。集合体のシッファー・エドモンドソンらせん投影(B)は、極性中心水性小孔領域を示している。ハプテン付着部位は矩形で描かれている。図6はCH-1へのハプテンの付着部位を示す。図7はチャネル形成免疫検定法の原理を模式的に示す図である。図8はCH-1のイオンチャネル活性を示す。(A)はアソレクチンリポソーム中、バリノマイシン誘導K<sup>+</sup> 拡散電位の脱分極を示す。(B)はガラス毛细管の先端における平面脂質二重層内の単一チャネル活性を示す。

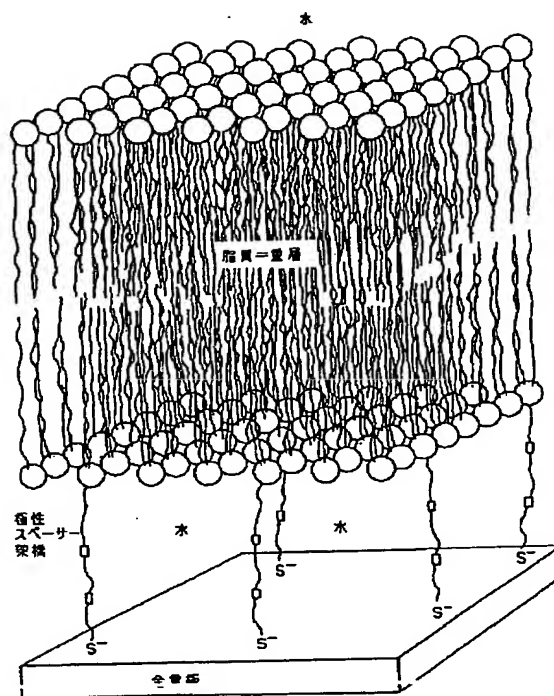
【图3】



【図1】



【図2】



【図4】

配列:

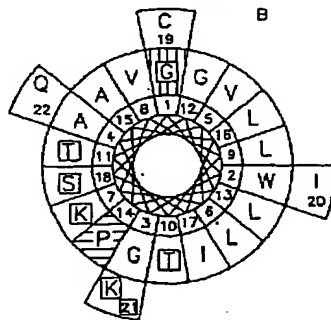
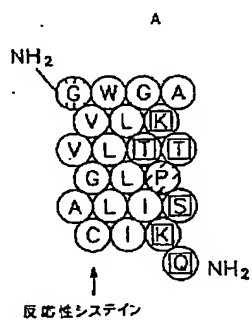
1 5 10 15  
 NH<sub>2</sub>-Gly-Trp-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-

Leu-Ile-Ser-Cys-Ile-Lys-Gln-アミド

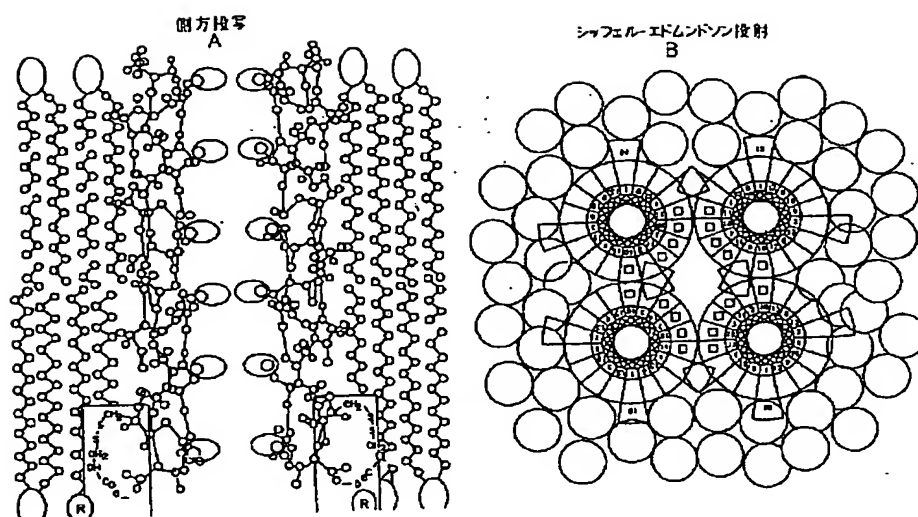
20

ヘリックスロッド:  
 側方投射

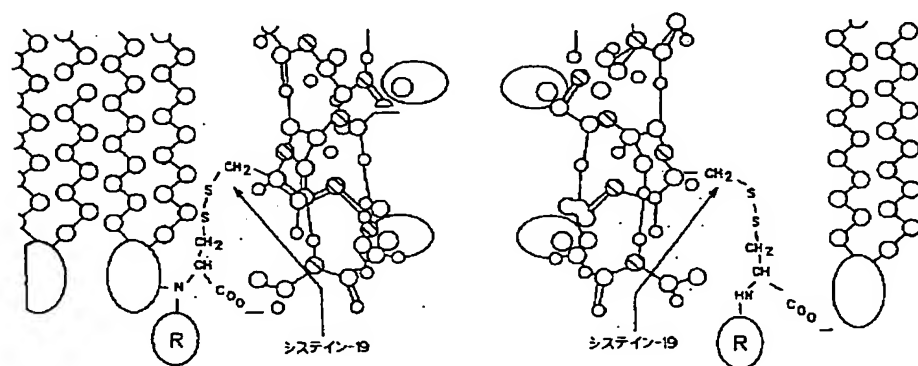
シッフェル-エドモンドソン投影



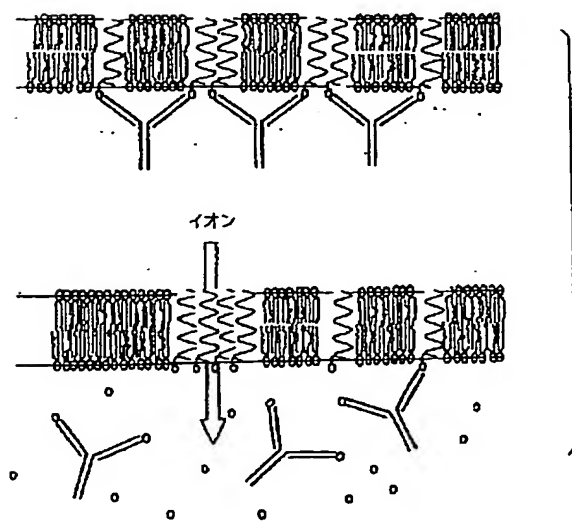
【図 5】



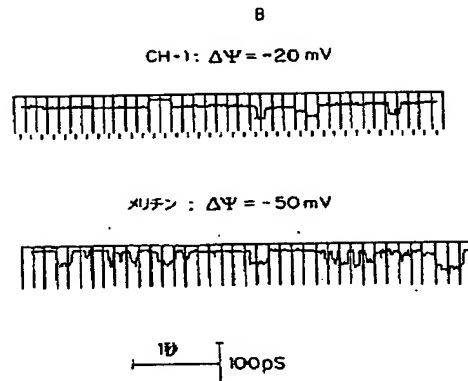
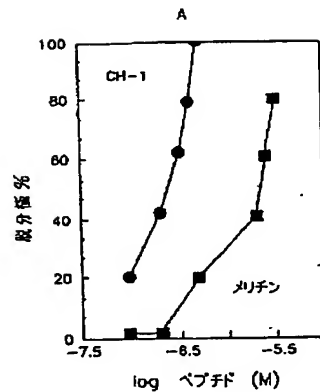
【図 6】



【図 7】



【図8】



## 【手続補正書】

【提出日】平成3年3月13日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】バイオセンサー

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) その頂部における参照電極、

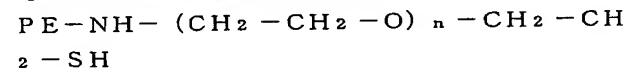
(2) その底部における記録電極、および(3) 合成または生物イオンチャネルを模した脂質二重層からなる両親媒性液体結晶膜から構成され、その脂質二重層は架橋係留分子を介して記録電極に付着しまたその両面でバルク水性電解質媒体に連続的に接触し、その境界は壁部の非極性物質との非極性的接触によってシールされている定性および定量分析用バイオセンサー。

【請求項2】 リン脂質残基に接合する親水性Spacerアームからなる架橋係留分子を介して溶媒とリン脂質

二重層が記録電極表面に付着している「請求項1」記載のバイオセンサー。

【請求項3】 架橋係留分子は、金属電極表面に付着するため末端にチオールまたはチオエーテル残基を有するポリオキシアルキレン鎖に結合するホスファチジルエタノールアミンからなる「請求項1または2」記載のバイオセンサー。

【請求項4】 架橋係留分子は式、



(式中、PE-NHはホスファチジルエタノールアミンの残基であり、nは約7～約24の整数、好ましくは11である)を有する「請求項1～3」記載のバイオセンサー。

【請求項5】 イオンチャネルは、天然の受容体、ならびにリガンドおよび第二の蛋白質のチャネル形成部と相互作用する受容部を有するハイブリッド受容体から選ばれる蛋白質である「請求項1～4」記載のバイオセンサー。

【請求項6】 イオンチャネルは、受容部としてハプテンと阻害リガンド成分としてハプテンに対する抗体を有する合成メリチン様ペプチドであり、ハプテンは被験物質または被験物質様残基である「請求項1～4」記載のバイオセンサー。

【請求項7】 イオンチャネルは式、  
 $\text{NH}_2\text{-Gly-Trp-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Cys-Ile-Lys-Gln-アミド}$   
 で示されるペプチドCH-1である「請求項6」記載のバイオセンサー。

【請求項8】 リガンドを含有するサンプルを、イオンチャネルがそのリガンドに対する受容体からなるかまたは少なくともその受容部がハイブリッド蛋白質のチャネル形成部からなり、そのリガンドの結合が脂質二重層内のイオンチャネルの開口を誘導して記録電極で測定される電気伝導度の変化を招く「請求項5」記載のバイオセンサーと接触させるリガンドの分析方法。

【請求項9】 被験物質を含有するサンプルを、イオンチャネルがハプテンとして上記被験物質または被験物質様残基を含み、ハプテンに対する抗体に結合しているメリチン様ペプチドである「請求項6」記載のバイオセンサーと接触させ、この場合、抗体分子が放出されて脂質二重層内のイオンチャネルの開口を誘導し、記録電極で測定される電気伝導度の変化を招来させる被験物質の分析方法。

【請求項10】 バイオセンサーは「請求項7」記載のバイオセンサーである「請求項9」記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】 発明の分野

本発明は、溶媒和脂質二重層が架橋係留分子を介して電極表面に付着しているバイオセンサーに関する。脂質二重層は生物または合成イオンチャネルを模したものである。このバイオセンサーは、定性および定量的分析に有用である。

##### 【0002】 発明の背景

生物系は、光、嗅い、神経—神経刺激等のような細胞外シグナルを、連結したカスケード様増幅反応の開始によって認識する。これらの多くでは、カスケードの開始または中間工程に、膜関連イオンチャネルの開口が関与している。リガンド活性化チャネルにおいては、その過程は、チャネル蛋白質に構造的にまたは機械的に連結した特異的受容体に対する小さなエフェクター分子（神経伝達物質、オードラントまたはフレーバー）の結合によって開始される。これは、脂質二重層を横切る孔部の開口を招き、膜の電気コンダクタンスの段階的増大を生じるチャネル蛋白質のコンホメーションの変化を誘導する。生物チャネルは人工脂質二重層に機械的に再生することが可能で、これは生体膜に生じると実質的に同一

のエフェクター誘導電流を招来する。現在利用できる電子増幅手段によればシグナルチャネルの開口現象を検知することができる。

【0003】 合成または天然起源の小さな両親媒性ペプチドが人工二重層でイオンチャネルを形成することが明らかにされている。二重層を横切る伝導路は、水の小孔の壁部を形成する数個のペプチドの整合的集合によって形成される。さらに、それらの一次配列を修飾することにより、特定のチャネルの性質を変更できる。膜の面内におけるペプチドの側方および回転可動性を制限することによって、独立に、チャネル形成を制御することかできる。

【0004】 したがって、イオンチャネルは、脂質二重層の核によって形成された誘導体を通過するイオンの流れを制御する装置である。二重層を、検知電極に、1) 高度に安定で、2) 蛋白質やペプチドがその内部にチャネルを作る媒体として働く能力を保持するように付着できれば、独特の種類のバイオセンサーが得られるはずである。

【0005】 両親媒性分子と固体表面との境界層は以前から知られている。ラングミュアとプロジェクトによって導入された方法が、電極へのリン脂質の吸着が関与する装置の開発にいまだに利用されている。この方法により、両親媒性分子の単分子膜が水—空気界面から固体表面に、それを順序正しく水コンパートメント内に押し込みついで引き上げると、移される。分子の両親媒性と水—空気界面から固体表面の通過の順序によって、層は固体表面に対する疎水性—親水性の方向性を変え、したがって累積二重層が形成される。これらの層が加湿条件下に作成されると、限られた可動性を有するわずかな水分子が二重層内に捕捉される。しかしながら、これらの系は二重層の間に、バルク型の溶媒水分子を保持することはできない。液体様の界面であれば、現実には、内部の累積マトリックスから外部層が脱着してしまうからである。したがって、第一層と電極表面の間のバルク水性媒体が絶対に容認できないことは明白である。

【0006】 ラングミュア—プロジェクト型デバイスにおけるバルク溶媒水の欠如は、生物学的様系の模倣、とくに機能性イオンチャネル形成ポリペプチドの導入にそれらを不適当にする。

【0007】 ラングミュア—プロジェクトの方法に従って作成された先行技術のデバイスの2つの例が、豪州特許出願AU40123/85およびWO89/01159号として公開されたPCT国際出願に見出される。

【0008】 AU40123/85には、検出すべき選ばれた物質が膜表面に存在すると、イオンを通過するように適合されたフィルムまたは膜を利用する固体状態の電気化学センサーが開示されている。とくに、この電気化学センサーは、ベース基層と、ベース基層に付着した物質の層を包含し、層へのイオンの輸送に応答して電流

を生じる。この層は実際、イオン流を電流に転換または変換する。また、イオンを検出すべき物質または化学種を含有する液体から層に輸送するため、層に付着させる膜を包含する。膜は、化学種と相互作用してイオンを液体から膜へ浸透させるゲート分子を包含する。

【0009】WO89/01159号は、自己集合性両親媒性分子がぎっしりつまって配列した膜で、複数のイオンチャネルおよび／または支持体と接合して受容体分子を構成する自己集合性分子の少なくとも一部からなることを特徴とする膜が記載されている。イオンチャネルは、ヘリックスおよびその集合体、コロナンド、クリプタンド、ボタンドならびにそれらの配合体を形成できるペプチドからなる群より選ばれる。支持体と接合した受容体分子からなる両親媒性分子においては、受容体分子は受容部位を有し、免疫グロブリン、抗体、抗体フラグメント、染料、酵素およびレクチンからなる群より選ばれる。支持体部は、脂質ヘッド基、炭化水素鎖、架橋可能分子および膜蛋白質からなる群より選ばれる。支持体部は受容体分子と受容部位から離れた末端において付着する。固体表面に付着したこのような膜二重層からなるバイオセンサーも開示されている。

#### 【0010】発明の要約

本発明は、合成または生物イオンチャネルを模倣した、電極付着溶媒和脂質二重層からなるバイオセンサーに関する。チャネルの開口は、検出される分子との相互作用によって誘導される。これは二重層伝導度の段階的増大を生じ、それが電極によって検知される。

【0011】とくに、脂質二重層は、架橋係留分子を介して記録電極に付着した両親媒性液体結晶膜であり、その両表面においてバルク水性電解質媒体に連続的に接触している。

【0012】架橋係留分子は、リン脂質残基、好ましくは、電極物質に強固に結合可能な残基たとえば-SHまたはチオエーテル残基を末端に有するポリオキシエチレン鎖をもつホスファチジルエタノールアミンに連結した親水性スパーアームからなる。

#### 【0013】図面の簡単な説明

図1は本発明のバイオセンサーの一般的設計を例示する図である。図2は溶媒和脂質二重層を係留している提案された電極を例示する図である。図3はハチ毒、メリチンの構造を示す図である。図4は本発明のペプチドCH-1の構造を示す図である。図5は、脂質二重層内に浸漬したヘリックス状の棒状集合体としてCH-1を模式的に示している。(A)は集合体の中心に向けた極性側鎖基(白丸、正確な縮尺で描かれたものではない)を示す。集合体のシフター-エドモンドソンらせん投影

(B)は、極性中心水性小孔領域を示している。ハプテン付着部位は矩形で描かれている。図6はCH-1へのハプテンの付着部位を示す。図7はチャネル形成免疫検定法の原理を模式的に示す図である。図8はCH-1の

イオンチャネル活性を示す。(A)アソレクチンリポソーム中、パリノマイシン誘導 $K^+$ 拡散電位の脱分極を示す。(B)はガラス毛细管の先端における平面脂質二重層内の単一チャネル活性を示す。

#### 【0014】好ましい態様の説明

本発明のバイオセンサーは、参照電極と記録電極からなり、これに架橋係留分子を介して両親媒性液体結晶脂質二重層膜が付着し、この膜はその両面でバルク水性電解質媒体に連続的に接触し、その二重層境界は脂質鎖の疏水性成分と非極性壁部の間の非極性接触によってシールされる。この二重層は、合成または生物イオンチャネルを模したもので、その開口は適当な外的影響との相互作用により、たとえば検出すべきリガンドによって誘導され、その結果、膜の電気的性質に変化を生じ、それが電極によって感知され、測定される。

【0015】本発明における好ましい脂質は、リン脂質たとえば大豆アソレクチンであり、好ましいイオンチャネルはヘリックスおよび集合体を形成できる蛋白質または合成ペプチドから構成される。

【0016】このデバイスの核である二重層は、蛋白質およびペプチドがその生物学的特異的活動をその中で発揮できる適当な媒体を構成しなければならないので、液体結晶状態に保持される。すなわち、チャネル蛋白質およびペプチドは、イオンチャネルの自発的形が可能なように、十分な側方可動性を保持していなければならない。同時に、膜はその内部に取り付けられるバイオセンサーデバイスが長い寿命を示すように機械的に安定でなければならない。適切に機能するためには、リン脂質二重層はバルク水媒体中に浸漬していなければならない。したがって、膜の両側には常にバルク水が存在しなければならない。

【0017】膜の電極表面への係留は、他の二重層構成成分の側方可動性により誘発される可能性がある干渉を最小にするように、二重層の機械的強化を目的に設計されている。この要求に合致するためには、細胞骨格または細胞マトリックスに対する細胞膜の相互作用に基づくアプローチが採用された。細胞骨格は、すべての生物細胞に共通な、膜の内側表面における別個の点に結合するポリペプチド肋材によって主として作られている機械的支持系である。類似の連結部により、赤血球や上皮細胞のような細胞の膜が長期間にわたり著しい機械的ストレスに対して耐えることを可能にしている。

【0018】これらの天然の系に従って、脂質二重層を電極に付着させる新規な方法が案出された。すなわち、2つの主要成分、一般的なリン脂質たとえばホスファチジルエタノールアミン(PE)、および末端が金属に対して高い親和性を有する残基で置換された高親水性スパーアームから構成される錨分子の合成を包含する。たとえば、様々な鎖長のオキシエチレンとその末端にチオールまたはチオエーテル残基を含有するホスファチジ



ルエタノールアミン誘導体を特定の錨分子として、チャネル機能に必要な動的性質を維持した安定な溶媒和二重層が、本発明により、金電極表面に付着された。

【0019】本発明による新規な電極付着脂質二重層を図2に例示する。この新規な構造は主として、二重層と電極の両表面にほぼ垂直に配置された複数の細長い錨分子または極性スペーサー架橋によって、電極（好ましくは、貴金属たとえば銀、金、白金、または金属メッキ）に付着された脂質二重層からなる。電極に付着した、ある厚さの層をなす全構造が水性媒体中に浸漬され、脂質二重層が膜を決定する。

【0020】本発明によるバイオセンサーの主要な特徴を図1に示す。テフロンブロック11は円形のウェル12を包含し、その底部に電極13が配置される。この電極13に、リン脂質二重層14（挿入図および図2も参照）が、二重層14と電極13の間のバルク水槽15が存在するようにして付着される。二重層の境界は側方で、リン脂質の疎水性成分とテフロンとの間の非極性接触によってシールされる。二重層はさらに、イオンチャネル形成ペプチド（図には示していない）を含有する。第二の参照電極16は二重層の上方に配置される。テフロン代わりに、炭化水素と強力に相互作用するプラスチック材料、たとえばポリスチレンを使用することもできる。

【0021】すなわち、その両表面でバルク水性媒体と強固に接触保持された両親媒性リン脂質二重層が形成される。この構造により、約50 Åから約75 Åのオーダーの厚さをもち、したがって包埋された機能性ペプチドおよび蛋白質を支持できる液体結晶膜が生成する。リン脂質膜は電極に接近して、それと平行に配置されるが、それとの間に空間をおいて、約15 Å～50 Åの長さの架橋錨分子によってそれと付着され、全構造が水性媒体中に置かれる。径約2 mmのバイオセンサーを試験し、著しく安定であることが見出された。

【0022】膜は、リン脂質に接合した適当な親水性スペーサーアームを介して電極に付着した溶媒和リン脂質二重層からなる。使用が好ましいアームは、ポリ（オキシエチレン） $n$ （ $n$ は約8～約25であることが好ましい）から構成されるが、鎖には他の極性残基が含まれていてもよく、たとえばポリアミノ酸鎖でもよい。鎖はすべて、その末端が、チオールもしくはチオエーテル残基、またはその他の電極に高い親和性をもつ適当な付着分子によって終結する。これらの分子の親水性部分は、親水性部分が水と強い相互作用を示す複数のオキシエチレン鎖で作られている天然のある種の界面活性剤分子、たとえばTritonと化学的に類似している。

【0023】この付着様式では、脂質二重層の組成に混合脂質を使用することが可能になる。たとえば、その小成分は付着に用いられるスペーサー分子をもつリン脂質で、大部分のリン脂質が二重層構造を決定するように選

択できる。

【0024】電極へ付着させる二重層の付着を細長いスペーサー分子によって行う本発明のアプローチには、以下の新しい特徴がある。すなわち、a) バルク水が電極表面および二重層の両側に存在する、b) 非係留脂質および二重層内に導入されたポリペプチドの移動が可能である、c) 二重層は適度の安定性と、電極表面に関して固定された幾何的配置を有し、これはその表面への錨分子の反復付着によるものである、d) 上記の固定された幾何的配置により、脂質二重層は電極の輪郭に従うので、原子分解時における電極表面の絶対的な平滑化は重要ではない。

【0025】本発明の二重層は、その開口によって膜を通すイオンの通過が可能になるイオンチャネルを模倣したものである。

【0026】チャネルを開口させるには少なくとも2つの方法がある。そのデバイス中に存在する成分蛋白質またはペプチドによって、チャネルの開口は2種の別個の機構によって誘発できる。第一は、予め存在する固定または組立てチャネルのリガンド誘発開口である。第二の機構は、両親媒性ペプチドが自発的に集合してチャネル集合体を形成するのを妨げている動揺の特異的な除去に基づくものである。

【0027】第一の分類には、生体膜中に存在する天然のチャネル、たとえばアセチルコリンまたはGABA受容体である。これらのチャネルは、適当な細胞から高度に精製するか、または遺伝子操作によって得られる。ついで、これらを電極支持人工二重層内に導入できる。次に、二重層を、非占拠時に受容体-チャネルが閉じた状態で支持されるように調整する。リガンドがその特異的受容体部位に結合すると、神経系の場合のように、チャネルの開口の引き金となるコンホメーション変化が誘発される。このアプローチは、*in vivo*における受容体によるアゴニストまたはリガンド感知をそのまま模倣したデバイスの形成を可能にする。アセチルコリン受容体の場合には、さらに、センサー集合体にアセチルコリンエステラーゼを添加すれば、アゴニストおよびアンタゴニスト両者に対する神経系の感受性のシミュレーションが可能になる。この可能性によりまた、第二の蛋白質のリガンドまたはチャネル形成部と相互作用する反復部位を含有するハイブリッド受容体分子が本発明により考慮できる。これらのハイブリッド分子は慣用の遺伝子操作法で製造できる。

【0028】第二の可能性は、メリチンまたはメリチン様ペプチド、たとえば本明細書においてはCH-1と呼ぶ新規な合成ペプチド（下記参照）に関するものである。これらは、適当な接近と軸方向をもって適度の集合状態に到着したとき、イオンチャネルとして機能する集合体を形成できる（図5参照）。この分類では、バイオセンサーは、要素の反復部分としてハプテン、阻害性リ

ガンド成分として抗体の使用に基づいて構築される。

【0029】CH-1ハプテン（図6参照）が二重層内に挿入されると参照電極のコンパートメントに向けられるCH-1の一端にハプテンを付着させると、上部溶媒コンパートメントに添加されたハプテンに対するモノクローナル抗体との相互作用が可能になる。ハプテン-CH-1に抗体が結合している限り、それらは、立体障害により、イオンチャネルの形成に必要な合成ハプテン-CH-1の適切な集合を防止する（図7、上部参照）。検知すべき遊離のハプテンまたはハプテン様分子（被験物質）の添加は、抗体結合部位に対する競合および抗体との相互作用からのハプテン-CH-1の放出により、イオンチャネルの自発的形成（図7、下部参照）とイオン伝導度の増大によるその検知を可能にする。この方法により、それに対する特異的モノクローナル抗体を生成する分子を検出できるバイオセンサーの設計が可能になる。

【0030】通常、単一のチャネルの伝導性は高い（pSとnSの間）ことから、数個の分子の結合によって誘発されるただ1個のチャネルの開口も容易に検知できる。これらの系で記録された感度はナノモルの範囲である。

【0031】上述のように、イオンチャネルまたはイオンチャネル部位の化学体との相互作用で、このようなチャネルの開口を生じる。同様にして、このようなチャネルは、適当な電磁線たとえばUVからIRまでおよびもっと高波長の種類の光のような電磁線と相互作用して、開口および伝導性の変化を生じさせることができる。光と相互作用してその構造を変え、その結果、センサーの伝導性を変化させる発色体または他の光感受体からなるイオンチャネルを構築することもできる。この目的に適当な分子は、適当な感作分子たとえばカルボシアニンまたはメロシアニンによってより長い波長に感作できるスチルベン誘導体を含有するペプチドである。

【0032】センサーイオンチャネルを閉鎖状態に戻すためには、ある種の弛緩機構が付与される。受容体結合アゴニストまたはリガンドは、チャネル受容部位から、結合した化学体を除去するのに適当な酵素を二重層内に導入するかまたは二重層の上方の水性コンパートメントのセルの壁部に付着させることによって除去される。酵素活性は、デバイスを検知すべき物質に暴露したとき、その濃度が一過性に上昇してチャネルを開くように調整される。本発明の新規なデバイスではジメンションが縮小されているので、拡散による応答時間が短縮される。次に、酵素分解により、検出すべき物質は低レベルに減少し、検出サイクルの再開が可能になる。チャネルの反応はきわめて早いので、チャネルと酵素の適当な組合せは実験によって容易に確立することができる。

【0033】チャネルの抗原-抗体依存性の振動は2工程洗浄操作によって回復する。第一の洗浄で検出分子-

抗体複合体が除去され、第二の操作は主として、遊離抗体分子の補充の働きがある。

【0034】電極と二重層の間の水槽内における電解質媒体の復元は逆イオン流入によって行われる。検出および参照電極の間に電場を発生させる。十分なシグナルが感知されたならば、同じ機構がイオンの流入を阻止するようにして、センサーの寿命を長くする。外部から負荷される電場に対するイオンチャネルの開口/閉鎖の感受性は、ペプチドの双極子能率、その空間的方向性、およびヘリックス骨格への機械的結合に依存する。

【0035】本発明のデバイスは様々の要求に容易に適応できる電子工学システムの集積部とすることができる。広スペクトルの化学的シグナルの検出に適している。脂質二重層の脂質成分の制御により、この系は4℃～40℃の温度で機能するようにできる。デバイスを熱調節ペルチェ体と適宜連結することにより操作温度を0℃以下または40℃以上に拡大できる。

【0036】適当な脂質二重層が安定な機能様式で電極に付着されたならば、バイオセンサーは、抗体が作成できるかまたはリガンド活性化天然チャネルが存在する任意、所望の分子を検出するために使用できる。必然に応じて、様々な成分が各種シグナルの検出のために使用できる。

【0037】次に本発明を以下の実施例によって例示するが、これは本発明を限定するものではない。

#### 【0038】例1 ペプチドCH-1の合成

小（アミノ酸20～25個）ペプチドによるイオンチャネルの生成の基盤となる原理は完全にはわかっていない。アラメチシンおよびメリチン（ミツバチ毒の乾燥重量の50%）のようなペプチドはそれらが両親媒性ヘリックスのペプチド（AHP）として挙動することから、イオンチャネルを形成することが示唆されている。すなわち、極性アミノ酸は、3.4周期性でポリペプチド鎖中に存在する。 $\alpha$ -ヘリックスの1ターンあたり3.6残基の生成では、極性側鎖はらせんロッドの同じ側を向くようになる。これはメリチンの配列ならびにそれが形成する $\alpha$ -らせんロッドの側方および上方投射によって例示できる（図3参照）。

【0039】メリチンは、本発明のペプチドの設計の出発点として選択された。これは水溶性で、通常テトラマーとして存在するものと思われる。しかしながら、それは多分、ポリペプチドのNH<sub>2</sub>末端における非極性の6個のアミノ酸セグメント（下線）の存在により、脂質二重層内に自発的に移動する。二重層内に取り込まれると、それは $\alpha$ -ヘリックス二次構造をよそおい、陰イオン選択性チャネルを形成する。このチャネルは、膜の面内における数個のヘリックスの集合体からなり、その疎水性側鎖が周囲の脂質と接触してできている。それらの親水性側鎖は脂質とは逆の方向を向いて、水性イオン伝導孔を形成する。しかしながら、経時的におよび/また

は二重層内にさらにメリチンが導入されるに及び、比較的に大きな孔部が生成し、セルの分解が優勢になってくる。メリチンの配列(図3)の調査に際して、それはカルボキシ末端の6個の塩基性アミノ酸のクラスター(ボールドおよび下線)をもつことが認められ、この塩基性アミノ酸のクラスターが、ポリL-リジンの場合のように、メリチンの分解性に関与するものと考えられた。

【0040】メリチンは、アラメチシン同様、14の位置にプロリンを含有する。興味あることに、プロリンは大部分の天然チャネルのイオン伝導セグメントの配列内に豊富である。プロリンは、その存在により規則的な $\alpha$ -ヘリックス骨格-水素結合の破壊を生じるアミノ酸である。アミド残基の1個または2個のカルボニル基は、水素結合せず、その非結合電極は $\alpha$ -ヘリックスの全体的極性および両親媒性コンフィギュレーションに寄与していない。

【0041】上述の考慮に基づき、メリチンの同族体を合成した。これは本明細書ではメリチンと呼び、以下の配列を有する。 $\text{NH}_2\text{-Gly-Trp-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Cys-Ile-Lys-Gln-アミド}$

【0042】CH-1(図4)にはいくつかの重要な修飾が行われた。第一に、メリチンのカルボキシ末端の3個の塩基性アミノ酸および1個のグルタミンは除去され、CH-1からは分解性が消失している。第二に、メリチンの残基2および19は、イソロイシンがトリプトファンに、トリプトファンがシステインにそれぞれ置換されている。CH-1分子の他の部分はメリチンと同じである。位置19のシステインは反応中心として導入された。これは、直接付着またはジスルフィド生成により、ヘリックス構造に変化を与えないで蛍光プローブ、ハプテンまたは所望のエピトープを含むペプチドの置換を可能にする。それは、合成後に、メチルジスルフィド誘導体として(システイン-S-S-CH<sub>3</sub>)保護された。還元すると、ペプチドCH-1のパッキングを変えないで容易に蛍光体を付着できる反応基が生成する。システイン-19はハプテンまたは所望のエピトープを含有するペプチドとの混合ジスルフィド接合体を形成させる(図5参照)反応中心として使用するのが最も重要である。

【0043】側方での会合により、CH-1ペプチド集合体はイオンチャネルを形成する。19の位置のシステインは、ハプテンの容易な付着を可能にする。たとえば、ハプテンを含有するトリニトロベンゼン(TNB)とのCH-1誘導体が製造された。このハプテンへの抗体、たとえば抗-TNB抗体の結合は、ポリペプチドの集合を阻害する。遊離のハプテンまたはハプテン様誘導体(被験物質)、たとえばTNBまたは他のニトロ化芳

香族化合物誘導体の存在は、抗体から競合によってCH-1ハプテン残基(たとえばCH-1-TNB)を放出させて、イオンチャネルを形成させる。これによって、CH-1に付着したハプテン誘導体(たとえばTNBまたは他のニトロ化芳香族化合物誘導体)と同一または類似の被験物質の存在をモニタリングできるバイオセンサーの構築が可能になる。CH-1にジスルフィド結合で付着させたシステイン含有ペプチドエピトープの使用も適当である。

【0044】CH-1 $\alpha$ -ヘリックスの比較的に親水性の角が立ったセクターは、テトラマー集合体の安定なイオンチャネルが構築されていることを示すものと思われる。図5は、脂質二重層内に浸漬されたヘリックスロッド集合体としてCH-1を模式的に示した図である。

(A)にお極性の側鎖基(白い丸、正しい縮尺で描かれてはいない)が集合体の中心に向かっていて、集合体のシッフエドムンセンによるヘリックス投射

(B)は、極性の中心水性孔部領域を示している。ハプテン付着部位は矩形で示されている。

【0045】集合を妨害する因子は開口したチャネルの形成の確率を低下させるものと思われる。チャネルの開口は、二重層面内における自発的な側方拡散による一過性の集合体形成がその原因になるという事実はまた、拡散に対する任意の妨害もイオンチャネル形成の確率を低下させることを示唆する。

【0046】ペプチドCH-1は、慣用の固相シンセサイザーに基づく独特のペプチドシンセサイザーを用い、改良されたカップリングおよび除去方法を用いて製造された。22工程のCH-1合成の総収率は80%であった。ついでペプチドを99%以上に精製すると、HPLC分析により単一の対称的なピークを生じた。

【0047】CH-1のチャネル形成活性の特徴は肉眼的および顕微鏡レベルで検査した。肉眼のレベルでは、リポソーム中のバリノマイシン電位を消失させるのに必要なCH-1の量を、ナトリウム媒体中に置いたK<sup>+</sup>含有リポソームへのバリノマイシンの添加によるLoewらの方法によって測定した。これは、膜内への陽イオン性染料の移動の誘発、蛍光の消失が認められる膜内外電位差を生じる。CH-1またはメリチンを添加すると、リポソーム膜内へのそれらの導入がバリノマイシン電位差を消失させ、染料の蛍光を回復させるイオンチャネルを誘発する。CH-1は、バリノマイシン電位差を消失させる能力に関しては、メリチンよりも有効であることが観察された(図8A)。

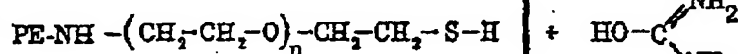
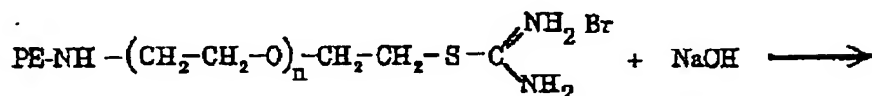
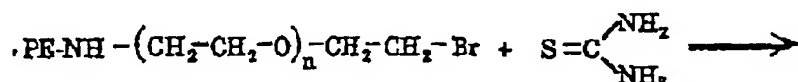
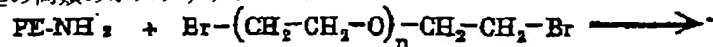
【0048】図8Bは、CH-1およびメリチンの単一チャネルの活性を顕微鏡で調べた結果を示している。これらの活性は、毛管二重層測定法を用いた標準イオンチャネル測定装置によって記録した。CH-1およびメリチンの等濃度(0.1mMNaCl中ペプチド0.1 $\mu$ g)は、明白な単一チャネル形成を生じ、それは有意な

期間、開かれたままであることが観察できた。

### 【0049】例2 架橋係留分子の合成

末端にメルカプタン基を有するポリエチレングリコール

で誘導体化した一連の同類のホスファチジルエタノール



【0050】ホスファチジルエタノールアミン-N-(オキシエチレン)<sub>11</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SHの合成は次のようにして実施した。すなわち、ポリエチレングリコール製品(平均分子量600)を使用した。これは平均12個のオキシエチレン基を含有する。それをホスファチジルエタノールアミンと反応させるためには、それをまず三塩化リンと反応させてジブromo誘導体に変換した。水抽出液をベンゼンで抽出して低分子量画分を除去し、ついでα, ωジブromoポリ(オキシエチレン)<sub>12</sub>をクロロホルムで抽出した。これは、プロトンNMR, 臭素の分析および2-ブタノン/H<sub>2</sub>O(1:1)による薄層クロマトグラフィー(R<sub>f</sub>=0.01)で特徴づけられた。ジブromoポリオキシエチレン誘導体(過剰)をテトラヒドロフラン-トリエチルアミン中、ホスファチジルアミンと封管内で加熱して結合させた。チオ尿素を添加して、テトラヒドロフランをイソプロパノールで置換させた。2時間還流するとブromo誘導体がイソチオウロニウム塩に変換され、これを次に穏和なアルカリ加水分解によってメルカプタンに変換した。ホスファチジルエタノールアミン-N-ポリ(オキシエチレン)-SHをシリカゲル中、溶出液としてクロロホルム-メタノール-酢酸-水を用いたクロマトグラフィーによって精製した。この誘導体は、リン酸塩とメルカプト基の1:1の存在によって特徴づけられた(5, 5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸からチオニトロ安息香酸の遊離によって測定)。さらに、これは、リン酸基1個あたり2個のアシル脂肪酸鎖を含有した。このアームは30Åのオーダーの水相スペーシングを支持する。

### 【0051】例3 金電極の表面における溶媒和二重層の形成方法

#### 3. 1. テフロン壁部のコーティング

アミン(PE)を製造して試験した。合成は次の一般的な操作に従って行った。

金線の導入前に、テフロンブロック内のウエルをヘキサ中へキサデカン1滴で満たした。これをテフロンと20分間相互作用させる。ついでこれを除去し、ウエルを0.1mM NaCl, 0.05M HEPES緩衝液、pH7.4の溶液で洗浄した。

#### 【0052】3. 2. 電極表面の調製

電極は金線を底部からウエル内に、その一端がウエルでシールされるように挿入して調製した。挿入前に、金線を酸でエッチングして洗浄した。

#### 【0053】3. 3. 混合ミセルの調製

大豆リン脂質をアセトンから抽出して中性脂肪を除去することにより精製し、乾燥し、ついでクロロホルム-メタノール(2:1)に溶解した。この溶液に、クロロホルム溶液中コレステロールを、リン脂質とコレステロールのモル比が5:1になるように添加した。さらに、テトラヒドロフランに溶解したホスファチジルエタノールアミン-N-エチレン(オキシエチレン)<sub>10</sub>エチレン-メルカプタン(例2の架橋分子)を、リン脂質と架橋分子のモル比が50:1になるように添加した。さらに、α-トコフェロールを、リン脂質200あたりα-トコフェロール1のモル比で添加した。混合後、溶媒を除去し、脂質を0.1mM NaCl, 0.05M HEPES緩衝液、pH7.4中オクチルグルコシドの溶液を添加して分散させ、ミセルを形成させた。オクチルグルコシドは、各リン脂質あたり2分子の界面活性剤が存在するように添加した。この比により、リン脂質、コレステロールおよび架橋アームを含有するオクチルグルコシドの混合ミセルが形成される。

【0054】3. 4. 混合ミセルの金電極への付着  
混合ミセルの溶液(3.3参照)を、テフロンウエルに加え、ミセルを架橋アームによって金に付着させる(2

時間〜一夜、室温)。混合ミセルが金電極に付着したのち、金電極の反対の末端でウエルに透析膜を付着させ、ウエル内に空気が捕捉されなかったことを確認した。全集合体をついで、0.1 mM NACl, 0.05 M HEPES緩衝液、pH 7.4を充填した大容器中に導入し、オクチルグルコシドを透析によって除去した。これには24時間を要した。透析膜を除去し、電極上の溶液を注意深く除去し、数回、0.1 mM NACl, 0.05 M HEPES緩衝液、pH 7.4によって置換した。

【0055】3.5. 生成した溶媒和二重層の試験  
アームによる金へのミセルの付着について、界面活性剤の透析を行う。これにより、電極に付着した連続二重層の生成と、その側部のヘキサデカン被覆テフロンとの相互作用によるシールが行われた。さらに、過剰の脂質がリポソームを形成するが、これは3.4に詳述した洗浄操作で除去される。電極をウエルの上部に置くことにより、この対称電極と金電極の間のインピーダンスの測定が可能になる。金属極に付着する二重層の形成とその側部のヘキサデカン被覆テフロンとの相互作用によるシールは、電極間の電流に対するきわめて高いインピーダンスの存在によって確認される。得られた値は、基礎伝達度が5〜10 pSのオーダーであることを示している。測定はMontal平面脂質二重層による単一チャンネル形成の測定に使用したのと同じ装置を用いて実施した。

【0056】例4 金付着溶媒和二重層の被験物質の濃度測定のための使用

本発明のデバイスは、サンプル中の被験物質の分析方法に有用である。この場合、サンプルは、ハブテンとして被験物質または被験物質様残基を含有するメリチン様ペプチドを模した脂質二重層からなり、全分子はハブテンに対する抗体に結合しているバイオセンサーと接触させる。ここに詳述する例では、ペプチドCH-1に接着させるハブテンとしてトリニトロベンゼン(TNB)を使用し、被験物質としての遊離TNB-誘導体の濃度を測定した。同様に、CH-1に付着させたサイロキシンを使用して、サンプル中の遊離サイロキシンを測定できる。

【0057】4.1. CH-1へのハブテン基の付着  
標準的ペプチド合成法によって、N-TNB-βアラニル-システインを製造した。これをホウ酸緩衝液、pH 8.0中で当量のジチオ-ビス-ニトロ安息香酸と反応させた。反応終了後(チオニトロ安息香酸の遊離を412 nmで測定した)、これを精製することなく0.6 mM DTTによりpH 9.0で予め処理し、ついでHPLCでCH-1のシステイン-19のチオール基を保護するために用いられたチオメチル基を除去したCH-1の溶液に加えた。反応はチオニトロ安息香酸の遊離によって追跡した。反応完了後、生成したN-TNB-βアラニル-システイン-CH-1ジスルフィドを、

アセトニトリル勾配を用いたHPLCによって精製した。

【0058】4.2. N-TNB-βアラニル-システイン-CH-1ジスルフィドとTNP-抗体および金電極に付着した二重層の相互作用

N-TNB-βアラニル-システイン-CH-1ジスルフィド(ハブテン-CH-1)を、TNB残基に対する高い特異性と高い親和性定数を有するモノクローナル抗体と処理した。ハブテン-CH-1のチャンネル活性を中和するのに必要な量を、ハブテン-CH-1の抗-ハブテン抗体による、Montalセットアップでの平面脂質二重層の存在下における滴定で測定した。この化学量論がわかると、ハブテン-CH-1と抗-ハブテン抗体が、チャンネルを中和する比率で、金電極に付着した二重層に添加される。測定された基礎チャンネル活性は無視できるものである。遊離N-TNB-アラニル-システインを被験物質として添加すると、遊離TNB誘導体とハブテン-CH-1-抗-ハブテン抗体複合体の競合によりハブテン-CH-1の放出が起こり、これが二重層中にイオンチャンネルを形成させる。チャンネル活性は、遊離されたハブテン-CH-1の濃度に相関し、一方これは被験物質の濃度に相関する。測定されるハブテン-CH-1の濃度は抗体親和性に依存して変動する。一般に、チャンネル形成はきわめて高い感度で検出できるので、ハブテンに対する抗-ハブテン抗体の親和性曲線の最初の3分の1に比例性が観察される。 $3 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$ の親和性をもつ抗体では、平均濃度 $10^{-8} \text{ M}$ の被験物質が検出できる。与えられた範囲内での応答の直線性は与えられた抗体について適当である。しかしながら、各抗体の検量は必要である。

【0059】例5 電極に付着したチャンネル蛋白質を含有する二重層の生成方法

生物イオンチャンネルを模倣した脂質二重層からなる本発明のバイオセンサーはサンプル中のリガンドの検出に有用である。この場合、サンプルは、受容体またはそのリガンドの受容体の受容部からなるハイブリッド分子によって構成されるイオンチャンネルを包含するバイオセンサーと接触させる。

【0060】5.1. アセチルコリン受容体を含有する混合ミセルの製造

アセチルコリン受容体は、Naja najaメキシンとの親和性クロマトグラフィーを用いる標準方法で精製した。ついでこれを、3.3に記載したと同一の成分を含む混合ミセル中に導入した。リン脂質とアセチルコリン受容体の比は200:1であった。

【0061】5.2. 金電極への混合ミセルの付着  
電極に付着した二重層の生成は、3.4に上述したのと同様にして実施した。

【0062】5.3. アセチルコリン存在下の活性  
アセチルコリン受容体を導入した膜で観察された基礎活

性は、ドバントを添加しない場合の値よりもわずかに高かった。伝導度は 10 ~ 15 pS の間で変動した。電極に付着した二重層の外側表面が浸漬されている媒体にアセチルコリンを添加すると、ノイズのレベルの上昇が出現し、異なる活性レベルを有する別個のチャネル現象が観察される。この活性の上昇は 30 分ほど続いた。総ノイズレベルの上昇および伝達性の上昇は、アセチルコリンの存在の検知を可能にする。アセチルコリンがなければ、また受容体と結合しない他のアミンの存在下には活性は低く維持される。アセチルコリンの添加により、シグナルは明らかに増大する。

【図面の簡単な説明】

図 1 は本発明のバイオセンサーの一般的設計を例示する図である。図 2 は溶媒和脂質二重層を係留している提案された電極を例示する図である。図 3 はハチ毒、メリチ

ンの構造を示す図である。図 4 は本発明のペプチド CH-1 の構造を示す図である。図 5 は、脂質二重層内に浸漬したヘリックス状の棒状集合体として CH-1 を模式的に示している。(A) は集合体の中心に向いた極性側鎖基(白丸、正確な縮尺で描かれたものではない)を示す。集合体のシッフアー-エドモンドソンらせん投影

(B) は、極性中心水性小孔領域を示している。ハプテン付着部位は矩形で描かれている。図 6 は CH-1 へのハプテンの付着部位を示す。図 7 はチャネル形成免疫検定法の原理を模式的示す図である。図 8 は CH-1 のイオンチャネル活性を示す。(A) はアソレクチンリポソーム中、バリノマイシン誘導 K<sup>+</sup> 拡散電位の脱分極を示す。(B) はガラス毛细管の先端における平面脂質二重層内の単一チャネル活性を示す。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 33/543

識別記号 庁内整理番号

Z 9217-2 J

F I

技術表示箇所



# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-090736

(43)Date of publication of application : 05.04.1994

(51)Int.Cl.

C12M 1/00

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/543

(21)Application number : 03-188434

(71)Applicant : YEDA RES & DEV CO LTD

(22)Date of filing : 09.01.1991

(72)Inventor : GITLER CARLOS  
YULI ITZHAK

(30)Priority

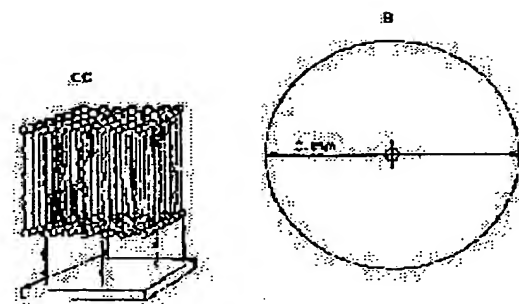
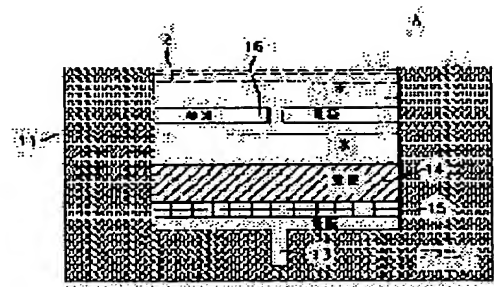
Priority number : 90 93020 Priority date : 09.01.1990 Priority country : IL

## (54) BIOSENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a biosensor for qualitative and quantitative analysis.

CONSTITUTION: This biosensor comprises an amphipathic liquid crystal membrane composed of a lipid bilayer attached to a recording electrode via bridging anchoring molecules. The lipid bilayer is doped with biologic or synthetic ion channels and is in continuous contact with a bulk aqueous medium on both its surfaces. The bridging anchoring molecules may contain a phospholipid moiety linked to a polyoxyalkylene chain terminated with a thiol or thioether residue.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

06.01.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3213341

[Date of registration]

19.07.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK (USPTO)